

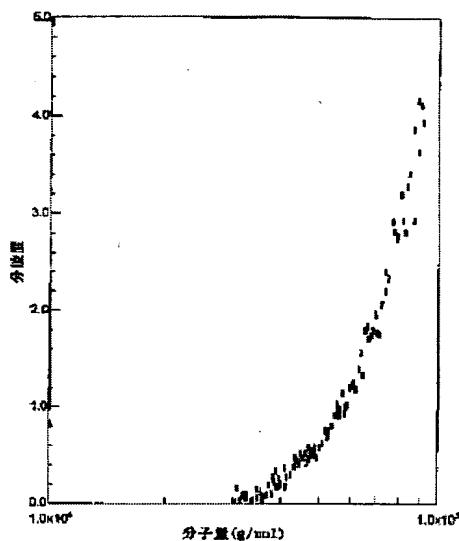
**SELF-CROSSLINKED HYALURONIC ACID, ITS PRODUCTION AND ITS USE**

AT

**Patent number:** JP2000248002  
**Publication date:** 2000-09-12  
**Inventor:** ARAI KAZUHIKO; MAEDA KAZUAKI; MIYATA YOSHIAKI  
**Applicant:** DENKI KAGAKU KOGYO KK  
**Classification:**  
- **international:** C08B37/08; C08B37/00; (IPC1-7): C08B37/08  
- **european:**  
**Application number:** JP19990042424 19990219  
**Priority number(s):** JP19990042424 19990219

**BEST AVAILABLE COPY****Report a data error here****Abstract of JP2000248002**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain the subject hyaluronic acid having an ideal biological compatibility as a medicinal material by partially including a molecular weight fraction having a specific branched degree. **SOLUTION:** This hyaluronic acid is obtained by partially including a molecular weight fraction having  $\geq 0.5$  branched degree. The hyaluronic acid in which the hyaluronic acid keeps a crosslinked structure and can be distinguished from a linear hyaluronic acid in a high polymer solution theory as a hyaluronic acid having a branching point. As the molecular weight and the branched degree, e.g., among the method for using differential refractometer and polyangle laser light scattering detector as a detector in a gel permeation chromatogram, by an elution volume method calculating a branched degree in comparing a molecular weight of hyaluronic acid of the same elution volume of fraction to the molecular weight of an objective linear hyaluronic acid. The objective hyaluronic acid can be formed by, e.g. a method for freezing an aqueous solution of hyaluronic acid having pH  $\leq 3.5$  and thawing.



---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-248002

(P2000-248002A)

(43)公開日 平成12年9月12日(2000.9.12)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

C 08 B 37/08

識別記号

F I

テマコード(参考)

C 08 B 37/08

Z 4 C 09 0

審査請求 未請求 請求項の数5 O.L (全 9 頁)

(21)出願番号

特願平11-42424

(22)出願日

平成11年2月19日(1999.2.19)

(71)出願人 000003296

電気化学工業株式会社

東京都千代田区有楽町1丁目4番1号

(72)発明者 新井 一彦前田 和章

東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化  
学工業株式会社中央研究所内

(72)発明者 宮田 喜明

東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化  
学工業株式会社中央研究所内

Fターム(参考) 4C090 AA01 AA03 AA07 AA09 BA67

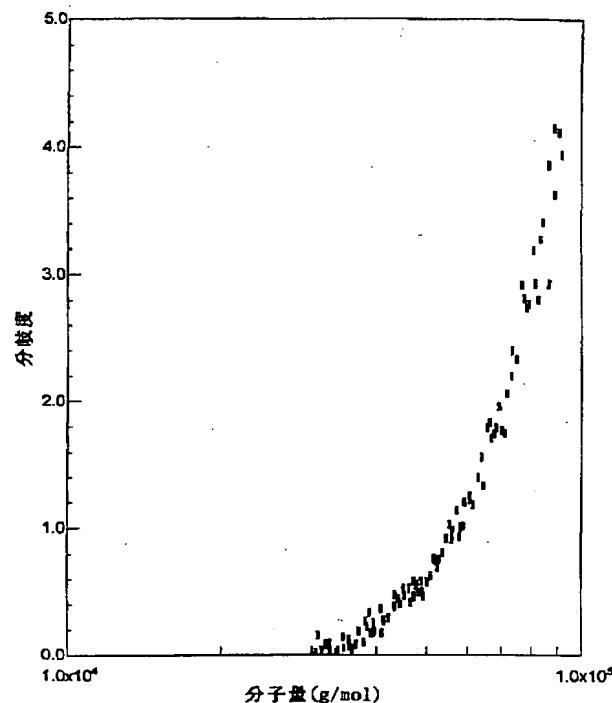
BD31 CA19 CA32 DA10 DA22

(54)【発明の名称】自己架橋ヒアルロン酸とその製造方法及びその用途

(57)【要約】

【課題】ヒアルロン酸自体が本来持っている優れた生  
体適合性の特徴を最大限生かすために、なんら化学的架  
橋剤や化学的修飾剤を使用することなく、またカチオン  
性の高分子と複合体化することなく、安全性及び生体適  
合性に優れた自己架橋ヒアルロン酸を提供すること。

【解決手段】分歧度が0.5以上の分子量フラクションを部分的に含むことを特徴とする自己架橋ヒアルロン酸を構成とする。



1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 分岐度が0.5以上の分子量フラクションを部分的に含むことを特徴とする自己架橋ヒアルロン酸。

【請求項2】 ヒアルロン酸のpH3.5以下の水溶液を凍結し、次いで解凍して形成されることを特徴とする請求項1記載の自己架橋ヒアルロン酸。

【請求項3】 ヒアルロン酸の水溶液を、pH3.5以下に調整し、該水溶液を凍結し、次いで解凍することを少なくとも1回行うことを特徴とする請求項2記載の自己架橋ヒアルロン酸の製造方法。

【請求項4】 ヒアルロン酸濃度5重量%以上でヒアルロン酸のカルボキシル基と等モル以上の酸成分を含むヒアルロン酸酸性水溶液から形成することを特徴とする請求項1記載の自己架橋ヒアルロン酸の製造方法。

【請求項5】 分岐度が0.5以上の分子量フラクションを部分的に含む自己架橋ヒアルロン酸を含有することを特徴とする医用材料。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規な自己架橋ヒアルロン酸及びその製造方法に関し、更にそれらの医用材料に関する。

## 【0002】

【従来の技術】ヒアルロン酸は、 $\beta$ -D-N-アセチルグルコサミンと $\beta$ -D-グルクロン酸が交互に結合した直鎖状の高分子多糖である。ヒアルロン酸は哺乳動物の結合組織に分布するほか、ニワトリのとさか、連鎖球菌の夾膜などにも存在が知られている。ニワトリのとさか、臍帯等が抽出材料として用いられているほか、連鎖球菌の培養物からも精製物が調製されている。

【0003】ヒアルロン酸は、分子量について多分散性であるが、種及び臓器特異性をもたず、生体に移植または注入した場合であっても優れた生体適合性を示すことが知られている。さらに、新しい物性を有するヒアルロン酸誘導体を得るために、多種多様な化学修飾、化学架橋が提案されている。ヒアルロン酸の化学修飾、化学架橋による水難溶化技術が多く報告されており、3次元架橋によるヒアルロン酸ゲルの形成も知られている。

【0004】これらの代表的なものとしては、ジビニルスルホン、ビスエポキシド類、ホルムアルデヒド等の二官能性試薬を架橋剤に使用して、得られた高膨潤性の架橋ヒアルロン酸ゲルを挙げることができる（米国特許第4,582,865号明細書、特公平6-37575号公報、特開平7-97401号公報、特開昭60-130601号公報参照）。

【0005】また、ヒアルロン酸のテトラブチルアンモニウム塩がジメチルスルフォキシド等の有機溶媒に溶解する特徴を利用したヒアルロン酸の化学的修飾方法が開示されている（特開平3-105003号）。また、ヒ

10

20

30

40

50

2

アルロン酸のテトラブチルアンモニウム塩をジメチルスルフォキシド中で、トリエチルアミンとヨウ化2-クロロ-1-メチルビリジニウムを加え反応させ、ヒアルロン酸のカルボキシル基と水酸基間でエステル結合を形成させる方法も開示されている（欧州特許0341745A1）。

【0006】また、共有結合を形成する化学的試薬を使用しない方法として、ヒアルロン酸とアミノ基あるいはイミノ基を有する高分子化合物とを、ヒアルロン酸のカルボキシル基と高分子化合物のアミノ基あるいはイミノ基をイオン複合体として結合させてヒアルロン酸高分子複合体を調製する方法が開示されている（特開平6-73103号公報参照）。

【0007】また、ヒアルロン酸水溶液を、pH2.0～3.8、20～80重量%水溶性有機溶剤存在下におくことを特徴とするヒアルロン酸ゲルの製造方法も開示されている（特開平5-58881号公報参照）。

【0008】また、一般的には、高分子水溶液から、凍結、解凍させる操作を繰り返すことにより高分子ゲルを製造する方法も提案されている。これらの代表的なものとしては、ポリビニルアルコール、グルコマンナンを挙げができる（特開昭57-190072号公報、特開平5-161459号公報参照）。

【0009】しかし、ヒアルロン酸及びヒアルロン酸を含む生体試料を精製又は保存する際に、凍結、解凍させる操作や凍結乾燥は、一般的手法として多用されているが、通常は中性で管理されているため、このような方法で自己架橋ヒアルロン酸が形成されるという報告は未だない。

## 【0010】

【発明が解決しようとする課題】ヒアルロン酸自体が本来持っている優れた生体適合性の特徴を最大限生かすために、なんら化学的架橋剤や化学的修飾剤を使用することなく、またカチオン性の高分子と複合化することなく、生体適合性医用材料として使用可能な、自己架橋ヒアルロン酸は未だ開発されていない。

【0011】本発明者らは、上記目的を達成するためには、ヒアルロン酸自体の物理化学的性質を鋭意検討してきた。その結果、（1）ヒアルロン酸の水溶液を特定のpHに調整し、該水溶液を凍結し、次いで解凍することを少なくとも1回行うことによって、（2）ヒアルロン酸濃度5重量%以上でヒアルロン酸のカルボキシル基と等モル以上の酸成分を含むヒアルロン酸酸性水溶液から形成することによって、自己架橋ヒアルロン酸が得られることを見出した。

【0012】また、従来法による改質ヒアルロン酸は、幾多の努力にもかかわらず化学的反応性物質を用いるため、新たな改質による毒性・生体不適合性等の危険性を本質的に抱え込まざるをえないという課題があった。

【0013】例えば、化学的修飾・架橋、及び金属塩な

どを用いるイオン的方法による、ヒアルロン酸誘導体は、たとえ生体内の貯留性などを改善できても、改質されたヒアルロン酸は架橋物質や金属などを共有結合やイオン結合でヒアルロン酸の分子中に内包するため、もはや天然ヒアルロン酸と構造が異なり、その生理作用や生体適合性、毒性を含む安全性が本質的にヒアルロン酸と同等であるとは言い難く、さらにこれら架橋剤等の残留毒性や、生体内に於ける分解産物に含まれる架橋剤の安全性の問題を完全に回避することは難しかった。

【0014】本発明者らは、本発明で得られた自己架橋ヒアルロン酸が医用材料として理想的な生体適合性を有することを見出し、本発明を完成させるに至った。

#### 【0015】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明は、(1) 分岐度が0.5以上の分子量フラクションを部分的に含むことを特徴とする自己架橋ヒアルロン酸、(2) ヒアルロン酸のpH 3.5以下の水溶液を凍結し、次いで解凍して形成されることを特徴とする(1)記載の自己架橋ヒアルロン酸、(3) ヒアルロン酸の水溶液を、pH 3.5以下に調整し、該水溶液を凍結し、次いで解凍することを少なくとも1回行うことを特徴とする(2)記載の自己架橋ヒアルロン酸の製造方法、(4) ヒアルロン酸濃度5重量%以上でヒアルロン酸のカルボキシル基と等モル以上の酸成分を含むヒアルロン酸酸性水溶液から形成することを特徴とする(1)記載の自己架橋ヒアルロン酸の製造方法、(5) 分岐度が0.5以上の分子量フラクションを部分的に含む自己架橋ヒアルロン酸を含有することを特徴とする医用材料である。

#### 【0016】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明に用いられるヒアルロン酸は、動物組織から抽出したものでも、また発酵法で製造したものでもその起源を問うことなく使用できる。発酵法で使用する菌株は自然界から分離されるストレブトコッカス属等のヒアルロン酸生産能を有する微生物、又は特開昭63-123392号公報に記載したストレブトコッカス・エクイF M-100(微研菌寄第9027号)、特開平2-234689号公報に記載したストレブトコッカス・エクイF M-300(微研菌寄第2319号)のような高収率で安定\*

$$\frac{Kc}{R(\theta)} = \frac{1}{MP(\theta)} + 2A_2 c + \dots \quad (1)$$

$$P(\theta)^{-1} = 1 + 1/3 \cdot k^2 \langle S^2 \rangle + \dots$$

$$4\pi$$

$$k = -\sin(\theta/2)$$

\*にヒアルロン酸を生産する変異株が望ましい。上記の変異株を用いて培養、精製されたものが用いられる。

【0017】本発明でいう自己架橋ヒアルロン酸は、ヒアルロン酸が架橋構造を保持し、分岐点を有するヒアルロン酸として、高分子溶液論的に直鎖状のヒアルロン酸と区別することができる。ヒアルロン酸自体は直鎖状の高分子であり、分岐構造を有さないことが知られている(多糖生化学1 化学編 共立出版 昭和44年)。

【0018】自己架橋ヒアルロン酸の分子量と分岐度を測定する方法には、ゲルバーミエションクロマトグラム(GPC)に検出器として示差屈折率計と多角度レーザー光散乱検出器(MALLS)を使うGPC-MALLS法、GPCに検出器として示差屈折率計と低角度レーザー光散乱検出器を使うGPC-LALLS法、あるいは、GPCに検出器として示差屈折率計と粘度計を使うGPC-粘度法がある。

【0019】本発明ではGPC-MALLS法を用い、GPCで分離された分子量フラクションの分子量と分岐度をオンラインで連続的に測定した。GPC-MALLS法では、GPCで分離された各フラクションの分子量と慣性半径を連続的に測定することができる。GPC-MALLS法には、自己架橋ヒアルロン酸の各フラクションの分子量と慣性半径の関係を、対照となる直鎖状ヒアルロン酸の各フラクションの分子量と慣性半径の関係と比較して分岐度を計算する慣性半径法と、同一溶出体積のフラクションのヒアルロン酸の分子量と対照となる直鎖状ヒアルロン酸の分子量を比較して分岐度を計算する溶出体積法がある。

【0020】本発明では、溶出体積法を使って分岐度の測定を行った。分岐度は自己架橋ヒアルロン酸の高分子鎖1コ当たりに存在する分岐点の数であり、自己架橋ヒアルロン酸の分子量に対してプロットされる。各フラクションの分子量と慣性半径は、有限濃度におけるジムプロット(1)式を用いて、分子量は散乱角度0°への外挿値、慣性半径は角度依存の初期勾配から、それぞれ以下の式に従って計算した。

#### 【0021】

#### 【数1】

【0022】ここで、Mは分子量、 $\langle S^2 \rangle$ は平均2乗慣性半径、Kは光学定数、R( $\theta$ )は散乱角度 $\theta$ における過剰還元散乱強度、cは高分子濃度、P( $\theta$ )は粒子散乱関数、 $\lambda$ は溶液中のレーザー光の波長、 $A_2$ は第2ビリアル係数でありヒアルロン酸では0.002 m<sup>1</sup>·m<sup>-1</sup>/g<sup>2</sup>である。cは示差屈折率計の出力から、ヒアルロン酸溶液の屈折率の濃度勾配(d n/dc : 0.153 m<sup>1</sup>/g)を使って計算した。

【0023】GPC-MALLS法では、過剰還元散乱強度から分子量と平均2乗慣性半径を計算しており、測定精度は過剰還元散乱強度の大きさに依存する。(1)

式から、過剰還元散乱強度は濃度と分子量両者の関数に\*

$$g = (M_1 / M_b)^{(a+1)/e}$$

【0026】ここで、aはMark-Houwink定数でヒアルロン酸では0.78である。eは素抜け因子で1.0とした。4官能性の長鎖無秩序分岐を仮定して、1本の高分子鎖上の分岐点の数B(分岐度)は以下の(3)式から※

1

$$g = \frac{1}{\left[ \frac{1 + \frac{B}{6}}{\left[ \frac{4B}{3\pi} \right]^{0.5}} \right]^{0.5}}$$
(3)

【0028】溶出体積法による分岐度の計算方法はGPC-MALLS法による分岐度測定と同じであり、その詳細は、サイズ排除クロマトグラフィー(共立出版 平成3年)に記載されている。

【0029】自己架橋ヒアルロン酸は、GPC溶媒で希釈して濃度を調製し、0.2 μmのメンブランフィルターでろ過した後測定に供した。本発明でいう自己架橋ヒアルロン酸中に、安定に存在する架橋構造がある場合、分岐構造が高分子溶液論的に確認される。

【0030】本発明でいう自己架橋とは、ヒアルロン酸以外に化学的架橋剤や化学的修飾剤等は使用しないことまた、カチオン性の高分子と複合体化しないことを意味するものである。また、自己架橋が進み、3次元架橋が形成されるとゲルとなることから、当該ゲルも本発明でいう自己架橋ヒアルロン酸に含まれることは言うまでもない。

【0031】ヒアルロン酸の化学的架橋剤は、ヒアルロン酸のカルボキシル基、水酸基、アセトアミド基と反応して共有結合を形成する多価化合物であり、ポリグリシルエーテル等の多価エポキシ化合物、ジビニルスルホン、ホルムアルデヒド、オキシ塩化リン、カルボシミド化合物とアミノ酸エステルの併用、カルボジイミド化

\*なる。試料の分子量に依存して、試料濃度と注入量を決定する必要がある。分子量フラクションに分別するGPCカラムの選択とともに、GPCカラムへの濃度負荷が現れない範囲内で、最大の試料濃度と注入量を選択する。

【0024】溶出体積法による各フラクションの分岐度は、以下の(2)式に従って計算した。同一溶出体積のフラクションで、分岐高分子の分子量をM<sub>b</sub>、直鎖高分子の分子量をM<sub>a</sub>とすると、収縮因子gが求まる。

【0025】

【数2】

(2)

※計算される。

【0027】

【数3】

合物とジヒドラジド化合物の併用を例として挙げることができる。

【0032】ヒアルロン酸の化学的修飾剤は、ヒアルロン酸のカルボキシル基、水酸基、アセトアミド基と反応して共有結合を形成する化合物であり、無水酢酸と濃硫酸の併用、無水トリフルオロ酢酸と有機酸の併用、ヨウ化アルキル化合物を例として挙げることができる。

【0033】ヒアルロン酸と複合体化するカチオン性の高分子は、ヒアルロン酸のカルボキシル基と高分子化合物のアミノ基あるいはイミノ基の間でイオン複合体を形成する高分子であり、キトサン、ポリリジン、ポリビニルビリジン、ポリエチレンイミン、ポリジメチルアミノエチルメタクリレートを例として挙げることができる。

【0034】本発明に用いられるヒアルロン酸は、動物組織抽出又は発酵法で得られた高分子精製品でも、更に加水分解処理等をして得た低分子量のものでも同様に好ましく使用できる。なお、本発明でいうヒアルロン酸は、そのアルカリ金属塩、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウムの塩をも包含する概念で使用される。

【0035】本発明に用いられるヒアルロン酸の水溶液は、ヒアルロン酸の粉末と水を混合し、攪拌して得られる。

【0036】まず、ヒアルロン酸の調整された酸性溶液の凍結解凍により得られる自己架橋ヒアルロン酸について述べる。ヒアルロン酸の水溶液のpHを調整するため使用する酸は、pH3.5以下に調整できる酸であれば、いずれの酸も使用することができる。酸の使用量を低減するために、好ましくは強酸、例えば、塩酸、硝酸、硫酸等を使用することが望ましい。

【0037】ヒアルロン酸の水溶液のpHは、ヒアルロン酸のカルボキシル基が充分な割合でプロトン化するpHに調整する。酸型のヒアルロン酸の解離の平衡定数は、ヒアルロン酸濃度の無限希釈のとき  $\log K_e = 4.25$  である (Acta Chimica Hungarica - Models in Chemistry 129(5) 671-683 1992)。調整されるpHはヒアルロン酸塩の対イオンの種類、ヒアルロン酸の分子量、水溶液濃度、凍結及び解凍の条件、並びに生成する架橋ヒアルロン酸等の諸特性により適宜決められるが、本発明では、pH3.5以下に調整することが必要である。好ましくは、pH2.5以下である。

【0038】凍結、解凍はヒアルロン酸の調整された酸性水溶液を、任意の容器に入れた後、所定の温度で凍結させ、凍結が終わった後、所定の温度で解凍させる操作を少なくとも1回行う。凍結、解凍の温度と時間は、容器の大きさ、水溶液量によりヒアルロン酸の酸性水溶液が凍結、解凍する温度と時間の範囲内で適宜決められるが、一般には、氷点以下の凍結温度、氷点以上の解凍温度が好ましい。

【0039】凍結、解凍時間を短くできることから、更に好ましくは-5°C以下の凍結温度、5°C以上の解凍温度が選ばれる。また、時間は、その温度で凍結、解凍が終了する時間以上であれば特に制限されない。

【0040】ヒアルロン酸の調整された酸性水溶液を凍結し、次いで解凍する操作の繰り返し回数は、使用するヒアルロン酸の分子量、水溶液濃度、水溶液のpH、凍結及び解凍の温度と時間、並びに生成する架橋ヒアルロン酸等の諸特性により適宜決められる。通常は1回以上繰り返すことが好ましい。また、凍結、解凍の操作を繰り返すごとに、その凍結、解凍の温度及び時間を変えても構わない。

【0041】本発明に用いられるヒアルロン酸濃度5重量%以上のヒアルロン酸酸性水溶液とは、ヒアルロン酸のカルボキシル基が充分な割合でプロトン化されるように調製された水溶液を意味している。酸性に調製するための用いる酸成分の量は、ヒアルロン酸塩の対イオンの種類、ヒアルロン酸の分子量、ヒアルロン酸濃度、並びに生成するゲルの強さ等の諸特性により適宜決められるが、一般にはヒアルロン酸のカルボキシル基と等モル以上の酸成分の量が好ましい。酸成分は、ヒアルロン酸より強い酸であれば、いずれの酸も使用することができる。酸の使用量を低減するために、好ましくは強酸、例えば、塩酸、硝酸、硫酸等を使用することが望ましい。

【0042】次に、ヒアルロン酸濃度5重量%以上のヒアルロン酸酸性水溶液より得る自己架橋ヒアルロン酸について述べる。本発明に用いられるヒアルロン酸濃度5重量%以上のヒアルロン酸酸性水溶液は、生成するヒアルロン酸ゲルの中和処理の前に、ゲル化を進行させるための熟成が必要である。この熟成させる温度や時間は、ヒアルロン酸酸性水溶液のヒアルロン酸塩の対イオンの種類、ヒアルロン酸の分子量、ヒアルロン酸濃度、並びに生成するゲルの強さ等の諸特性により適宜決められるが、温度については、ヒアルロン酸酸性水溶液が凍結しないために、そして、ヒアルロン酸の酸による分解を抑えるために、-10°C以上30°C以下で行うことが好ましい。

【0043】本発明に用いられるヒアルロン酸濃度5重量%以上のヒアルロン酸酸性水溶液の調製方法は問わないが、固体ヒアルロン酸と酸性水溶液を混合する方法、低濃度で調製したヒアルロン酸酸性水溶液を所定の濃度に濃縮する方法や、高濃度のヒアルロン酸水溶液に酸成分を加える方法などが挙げられる。

【0044】固体ヒアルロン酸と酸性水溶液を混合する方法の場合、混合する固体ヒアルロン酸の形態は問わないが、粉末、ヒアルロン酸粉末を加圧成型して得られるブロック状の成型物、ヒアルロン酸を蒸留水に溶解して水溶液にした後、通風乾燥して得られるキャストフィルムや凍結乾燥後に得られるスポンジ状ヒアルロン酸などの形態が考えられる。混合方法としては、固体ヒアルロン酸に酸性水溶液を所定の濃度になるように含浸させる方法や、固体ヒアルロン酸に酸性水溶液を添加し混練する方法などがある。

【0045】低濃度で調製したヒアルロン酸酸性水溶液を所定の濃度に濃縮する方法の場合、まず、固体ヒアルロン酸を蒸留水に溶解した後に酸成分を加える事や固体ヒアルロン酸を直接酸性水溶液に溶解する事などによって、低濃度のヒアルロン酸酸性水溶液を調製する。ここで、溶解する固体ヒアルロン酸の形態は問わない。また、ここでいう低濃度とは、目的のヒアルロン酸ゲルのヒアルロン酸濃度より低いことをいうが、扱い易いと言う点で好ましくはヒアルロン酸濃度が5重量%以下が望ましい。濃縮方法としては、超遠心分離、通風乾燥、減圧乾燥、凍結乾燥などが挙げられる。

【0046】高濃度のヒアルロン酸水溶液に酸成分を加える方法の場合、まず、固体ヒアルロン酸と蒸留水を混合することや、低濃度のヒアルロン酸水溶液を濃縮することなどにより、高濃度のヒアルロン酸水溶液を調製する。この時に用いる固体ヒアルロン酸の形態は問わない。得られた高濃度のヒアルロン酸水溶液に酸成分を添加する方法としては、気体状態の酸、例えば塩化水素の雰囲気下に曝す方法や、ヒアルロン酸に対して貧溶媒の酸溶液、例えばエタノール-塩酸溶液中に浸す方法などが挙げられる。

【0047】ヒアルロン酸の調整された酸性溶液の凍結解凍により得られた自己架橋ヒアルロン酸、及びヒアルロン酸濃度5重量%以上のヒアルロン酸酸性水溶液より得られた自己架橋ヒアルロン酸は、ヒアルロン酸の酸加水分解を避けるために、酸性に調整するために用いた酸等の成分を除く必要がある。酸等の成分を除くためには、通常は水性溶媒による洗浄もしくは透析を行う。自己架橋ヒアルロン酸の機能を損なわないものであれば特に制限はないが、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝液等が用いられるが、好ましくは、生理食塩水、リン酸緩衝液等が用いられる。

【0048】この洗浄された自己架橋ヒアルロン酸は、その使用目的に応じて、溶液状、溶媒中に浸漬した状態、溶媒を含ませた湿润状態、風乾、減圧乾燥あるいは凍結乾燥等の処理を経た乾燥状態で医用材料として供される。

【0049】医用材料として用いるためには、生体適合性が高いことが必須であり、一般的に細胞毒性がないことを証明する必要がある。本発明の自己架橋ヒアルロン酸は、これらの条件を十分に満たすものであり、生体分解性医用材料としてまたヒアルロン酸が用いられる分野であれば特に制限なく使用することができる。例えば、癒着防止材、関節注入剤、軟質組織注入剤、代用硝子体、化粧料、診断・治療に用いる医療器具・医療用具等の生物医学的製品又は医薬組成物への使用が挙げられる。

【0050】自己架橋ヒアルロン酸及びその成形加工品は、単一形態での使用は当然ながら、異なる自己架橋ヒアルロン酸の形態との混合又は併用、更にヒアルロン酸溶液との混合又は併用による組合せ処方により効果の増強が期待できる。

#### 【0051】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳しく説明する。なお、本発明はこれにより限定されるものではない。

#### 【0052】実施例1

分子量が $3.5 \times 10^5$ ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを蒸留水に溶解し、1.5重量%のヒアルロン酸の水溶液を調整した。調整されたヒアルロン酸の水溶液のpHは、6.0であった。この水溶液のpHを、1N塩酸でpH 1.5に調整した。ヒアルロン酸の酸性水溶液15mLを30mLの容器に入れ、-20°Cに設定した冷凍庫に入れた。24時間、48時間、72時間凍結した後、25°Cで解凍した。その結果、架橋ヒアルロン酸が得られた。

#### 【0053】実施例2

実施例1に於いて、分子量が $2.2 \times 10^5$ ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを溶解してヒアルロン酸の水溶液を調整した。実施例1と同様に調整し、-20°Cに設定した冷凍庫に入れた。24時間、48時間、72時間

10

凍結した後、25°Cで解凍した。その結果、架橋ヒアルロン酸が得られた。

#### 【0054】実施例3

実施例1に於いて、分子量が $6.0 \times 10^5$ ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを溶解してヒアルロン酸の水溶液を調整した。実施例1と同様に調整し、-20°Cに設定した冷凍庫に入れた。40日間凍結した後、25°Cで解凍した。その結果、架橋ヒアルロン酸が得られた。

#### 【0055】実施例4

実施例1に於いて、分子量が $4.0 \times 10^5$ ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを溶解してヒアルロン酸の水溶液を調整した。実施例1と同様に調整し、-20°Cに設定した冷凍庫に入れた。40日間、62日間、81日間凍結した後、25°Cで解凍した。その結果、架橋ヒアルロン酸が得られた。

#### 【0056】実施例5

実施例1に於いて、分子量が $2.0 \times 10^5$ ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを溶解してヒアルロン酸の水溶液を調整した。実施例1と同様に調整し、-20°Cに設定した冷凍庫に入れた。81日間凍結した後、25°Cで解凍した。その結果、架橋ヒアルロン酸が得られた。

#### 【0057】実施例6

実施例4に於いて、62日間凍結した後、25°Cで解凍し、pH 1.5のヒアルロン酸水溶液を、0.2NのNaOH水溶液でpH 7.0に中和した。中和したヒアルロン酸水溶液を凍結乾燥し、架橋ヒアルロン酸を回収した。

#### 【0058】実施例7

分子量が $2.0 \times 10^5$ ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを重水に溶解し、1.5重量%のヒアルロン酸の水溶液を調整した。調整されたヒアルロン酸の水溶液のpDは、6.0であった。この水溶液のpDを、1N重塩酸の重水溶液でpD 1.1に調整した。ヒアルロン酸の酸性水溶液15mLを30mLの容器に入れ、-20°Cに設定した冷凍庫に入れた。81日間凍結した後、25°Cで解凍した。その結果、架橋ヒアルロン酸が得られた。

#### 【0059】実施例8

分子量が $2.2 \times 10^5$ ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを1N塩酸水溶液に溶解し、20重量%のヒアルロン酸の水溶液を調製した。ヒアルロン酸の酸性水溶液15mLを30mLの容器に入れ、5°Cに設定した冷凍庫に入れた。33日間冷蔵し、架橋ヒアルロン酸が得られた。

#### 【0060】比較例1

実施例1に於いて、ヒアルロン酸の水溶液のpHを調整せずに、凍結し、24時間、48時間、72時間凍結した後、25°Cで解凍した。

#### 【0061】比較例2

実施例8に於いて、ヒアルロン酸の水溶液のpHを調整

50

せずに、33日間冷蔵した。

#### 【0062】実施例9

##### 架橋ヒアルロン酸の分子量

実施例1～8で得られた架橋ヒアルロン酸と比較例1、2で回収されたヒアルロン酸の分子量は、GPC-MALLSを使って測定した。GPC溶媒でポリマー濃度を0.2重量%、0.1重量%、0.05重量%に調製し、0.2μmのメンブランフィルターでろ過した後、0.1ml注入してGPC-MALLSの測定を行った。GPCカラムとして昭和電工社製SB806HQを1本、またはWaters社製Ultrahydrogel 1500を1本使用し、示差屈折率検出器として日本分光社製830-R I、MALLSはWyatt社製DAWN DSP-Fを使用して、溶媒硝酸ナトリウムの0.2M水溶液、測定温度40°C、流速0.3ml/分、データ取得間隔1回/2秒で測定した。散乱強度の測定は散乱角度28.7°～90°の8検出器を使った。データ処理ソフトウェアはWyatt社製ASTRA Version 4.10を使用した。測定結果を表1に示す。

#### 【0063】

【表1】

	反応時間	重量平均分子量
実施例1	24時間	4.3×10 <sup>5</sup>
	48時間	4.7×10 <sup>5</sup>
	72時間	6.1×10 <sup>5</sup>
実施例2	24時間	2.2×10 <sup>5</sup>
	48時間	2.6×10 <sup>5</sup>
	72時間	2.9×10 <sup>5</sup>
実施例3	40日間	5.8×10 <sup>5</sup>
実施例4	62日間	1.0×10 <sup>5</sup>
	81日間	1.4×10 <sup>5</sup>
実施例5	81日間	2.8×10 <sup>4</sup>
実施例6	62日間	1.0×10 <sup>5</sup>
実施例7	81日間	3.7×10 <sup>4</sup>
実施例8	33日間	1.2×10 <sup>5</sup>
比較例1	24時間	3.5×10 <sup>5</sup>
	48時間	3.5×10 <sup>5</sup>
	72時間	3.3×10 <sup>5</sup>
比較例2	33日間	2.0×10 <sup>5</sup>

#### 【0064】実施例10

##### 架橋ヒアルロン酸の分子量分布

実施例4で得られた架橋ヒアルロン酸と分子量が4.0×10<sup>4</sup>ダルトンのヒアルロン酸の分子量分布は、GPCを使って測定した。GPC溶媒でポリマー濃度を0.2重量%に調製し、0.2μmのメンブランフィルターでろ過した後、0.1ml注入してGPCの測定を行った。GPCカラムとしてWaters社製Ultrahydrogel 1500を1本、示差屈折率検出器として日本分光社製830-R Iを使用し、溶媒硝酸ナトリウムの0.2M水溶液、測定温度40°C、流速0.3ml/分、データ取得間隔1回/2秒で測定した。測定結果を図1に示す。

#### 【0065】実施例11

##### 架橋ヒアルロン酸の分岐度測定

実施例4、反応時間81日間で得られた架橋ヒアルロン酸と分子量が4.0×10<sup>4</sup>ダルトンのヒアルロン酸は、GPC溶媒でポリマー濃度を0.2重量%に調製し、0.2μmのメンブランフィルターでろ過した後、0.1ml注入してGPC-MALLSの測定を行った。GPCカラムとしてWaters社製Ultrahydrogel 1500を1本、示差屈折率検出器として日本分光社製830-R Iを使用し、溶媒硝酸ナトリウムの0.2M水溶液、測定温度40°C、流速0.3ml/分、データ取得間隔1回/2秒で測定した。測定結果を図2に示す。

【0066】表1の結果から、例えば、実施例1では反応時間が長くなるに従って、重量平均分子量が3.5×

$10^5$  から、 $4.3 \times 10^5$ 、 $4.7 \times 10^5$ 、 $6.1 \times 10^5$  と増大している。実施例2、実施例3、実施例4、実施例5と原料となるヒアルロン酸の分子量が小さくなつても、反応時間が長くなるに従つて分子量が増大している。

【0067】表1の結果から、実施例6では、回収した架橋ヒアルロン酸を中和、凍結乾燥しているが、実施例4と同様に分子量が増大している。実施例7では、反応溶媒に重水を使用している。軽水を使用している実施例5と比較して、分子量の増大が大きくなっている。実施例8では、反応時間が $5^{\circ}\text{C}$ だが、反応温度が $-20^{\circ}\text{C}$ の実施例1～実施例7と同様に分子量が増大している。

【0068】図1の結果から、分子量の増大が分子量分布の変化、つまり高分子量成分の生成に起因していることが分かる。実施例4で反応時間81日間で得られた架橋ヒアルロン酸の直鎖状ヒアルロン酸（分子量 $4.0 \times 10^5$  ダルトン）に対する分岐度の計算結果を図2に示す。

【0069】分岐度は同一溶出体積のフラクションの両\*

培養条件 プレート：細胞培養用12ウェルプレート  
培地：D MEM 培地 + 10%ウシ胎児血清、2 ml/ウェル  
温度： $37^{\circ}\text{C}$  (5%CO<sub>2</sub> 下)  
播種細胞数： $1 \times 10^4$  個/ウェル

【0072】培養開始後2日、5日、8日後に、細胞密度を倒立顕微鏡を用いて観察したところ、実施例1～8いずれの架橋ヒアルロン酸が共存していてもコントロールと同様に良好な増殖を示した。よって、本発明で得られた架橋ヒアルロン酸には細胞毒性作用がなく、医用材料として使用可能であることが示唆された。

【0073】

【発明の効果】以上、本発明によれば、なんら化学的架橋剤や化学的修飾剤を使用することなく、自己架橋ヒアルロン酸が得られる。化学的架橋剤や化学的修飾剤を使用することに起因する生体適合性への悪影響が避けられ、生体適合性材料分野に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例4で反応時間62日間、及び81日間で

\*者の分子量から、式2と式3を使って計算した。図2から、架橋ヒアルロン酸の分岐度は分子量約3万以上の領域で、分岐度0.5以上から急速に増大していくことがわかる。すなわち、本発明で得られた架橋ヒアルロン酸は、安定な架橋構造が存在していることにより、分岐ヒアルロン酸となり、分子量が増大していることがわかる。

【0070】実施例12

#### 架橋ヒアルロン酸の細胞毒性試験

正常ヒト皮膚由来線維芽細胞培養において、本発明で得られた架橋ヒアルロン酸を共存させ、細胞増殖挙動の観察によりその細胞毒性を評価した。実施例1～5記載の架橋ヒアルロン酸をリン酸緩衝生理的食塩水に透析し、細胞を播種した細胞培養用プレート（ファルコン社製）中に20 mgづつ添加した。以下の培養条件で培養し、細胞増殖能を評価した。また、架橋ヒアルロン酸非存在下での培養をコントロールとした。

【0071】

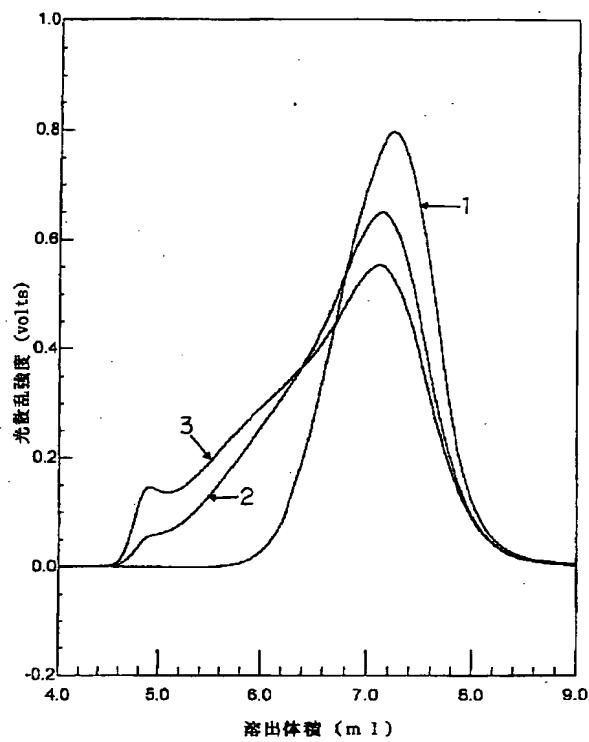
30 得られた架橋ヒアルロンと直鎖状ヒアルロン酸（分子量 $4.0 \times 10^5$  ダルトン）のGPCクロマトグラムである。

【図2】実施例4で反応時間81日間で得られた架橋ヒアルロン酸の直鎖状ヒアルロン酸（分子量 $4.0 \times 10^5$  ダルトン）に対して計算した分岐度と分子量の関係を示すグラフである。

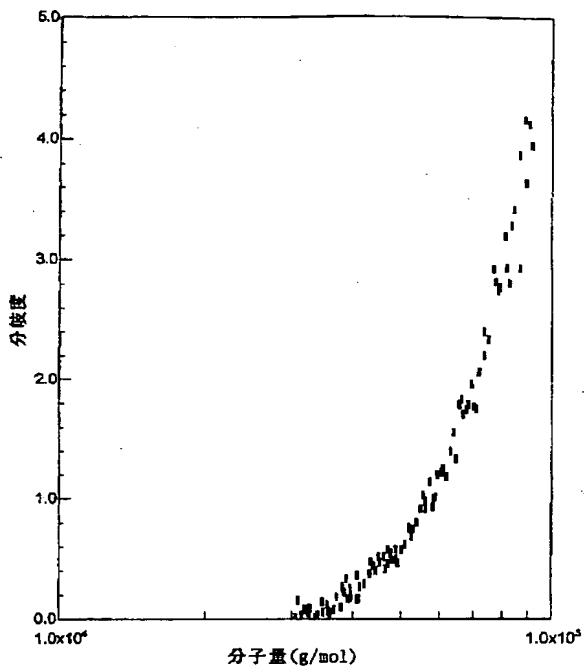
#### 【符号の説明】

- 1 直鎖状ヒアルロン酸（分子量 $4.0 \times 10^5$  ダルトン）のGPCクロマトグラム
- 2 実施例4で反応時間62日間で得られた架橋ヒアルロンのGPCクロマトグラム
- 3 実施例4で反応時間81日間で得られた架橋ヒアルロンのGPCクロマトグラム

【図1】



【図2】



【正誤表】

【公開番号】

特開2000-245381 (P2000-245381A)  
特開2000-287578 (P2000-287578A)  
特開2000-279662 (P2000-279662A)  
特開2000-279663 (P2000-279663A)  
特開2000-279664 (P2000-279664A)  
特開2000-279670 (P2000-279670A)  
特開2000-229172 (P2000-229172A)  
特開2000-270949 (P2000-270949A)  
特開2000-270950 (P2000-270950A)  
特開2000-197880 (P2000-197880A)  
特開2000-229215 (P2000-229215A)  
特開2000-218545 (P2000-218545A)  
特開2000-225971 (P2000-225971A)  
特開2000-219477 (P2000-219477A)  
特開2000-247741 (P2000-247741A)  
特開2000-226338 (P2000-226338A)  
特開2000-226340 (P2000-226340A)  
特開2000-281611 (P2000-281611A)  
特開2000-239669 (P2000-239669A)  
特開2000-248002 (P2000-248002A)  
特開2000-239887 (P2000-239887A)  
特開2000-230515 (P2000-230515A)

第1部門(1)

## 出願人の名義変更

(平成13年1月16日(2001.1.16)発行)

特許公開番号	分類	識別記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2000-245381	A23L 1/202		平11- 49250	399008047 高橋 延太郎 秋田県秋田市泉字登木109- 3 390015059 小玉醸造株式会社 秋田県南秋田郡飯田川町飯塚 字飯塚34番地- 1 代理人 100108051 小林 生央	591108178 秋田県 秋田県秋田市山王4丁目1番 1号 390015059 小玉醸造株式会社 秋田県南秋田郡飯田川町飯塚 字飯塚34番地- 1 代理人 100108051 小林 生央
2000-287578	A01K 61/00		平11- 97826	000000446 岡部株式会社 東京都墨田区押上2丁目8番 2号	000000446 岡部株式会社 東京都墨田区押上2丁目8番 2号 500157332 株式会社金田建設 島根県隠岐郡西郷町大字港町 字大津の二・13番地4 代理人 100098947 福島 英一

上記は出願公開前に承継されたものである。

第1部門(2)

## 正誤表

(平成13年1月16日(2001.1.16)発行)

特許公開番号	分類	識別記号	箇所	誤	正
2000-279662	D05B 19/02		原願表示もれ	脱落	分割の表示 特願平9-264700の分割
2000-279663	D05B 19/02		原願表示もれ	脱落	分割の表示 特願平9-284699の分割
2000-279664	D05B 19/02		原願表示もれ	脱落	分割の表示 特願平9-267425の分割
2000-279670	D05B 27/24		原願表示もれ	脱落	分割の表示 特願平10-175024の分割

第1部門(2)

## 出願人の名義変更

(平成13年1月16日(2001.1.16)発行)

特許 公開番号	分類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2000-229172	A63F 9/22		平11- 33170	000105637 コナミ株式会社 東京都港区虎ノ門四丁目3番 1号 代理人 100083839 石川 泰男	500092619 株式会社コナミコンピュータ エンタテインメントジャパン 東京都渋谷区恵比寿四丁目20 番3号 代理人 100083839 石川 泰男
2000-270949	A47C 1/026		平11- 78527	590001164 シロキ工業株式会社 神奈川県藤沢市桐原町2番地 代理人 100085187 井島 藤治	590001164 シロキ工業株式会社 神奈川県藤沢市桐原町2番地 000102692 エヌティイエヌ株式会社 大阪府大阪市西区京町堀1丁 目3番17号 代理人 100085187 井島 藤治
2000-270950	A47C 1/026		平11- 78528	590001164 シロキ工業株式会社 神奈川県藤沢市桐原町2番地 代理人 100085187 井島 藤治	590001164 シロキ工業株式会社 神奈川県藤沢市桐原町2番地 000102692 エヌティイエヌ株式会社 大阪府大阪市西区京町堀1丁 目3番17号 代理人 100085187 井島 藤治

上記は出願公開前に承認されたものである。

第2部門(1)

## 出願人の名義変更

(平成13年1月16日(2001.1.16)発行)

特許 公開番号	分類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2000-197880	B09C 1/04		平11- 1653	500103638 本橋 節子 東京都保谷市ひばりが丘北1 丁目10番26号 代理人 100075856 富田 幸春	500277467 東福商事有限会社 東京都保谷市ひばりが丘北1 丁目10番26号 代理人 100075856 富田 幸春
2000-229215	B01D 53/22		2000- 23756	392032409 プラクスエア・テクノロジー ・インコーポレイテッド アメリカ合衆国06810-5113コ ネティカット州ダンパリー、 オールド・リッジパリー・ロ ード39 代理人 100067817 倉内 基弘(外1名)	392032409 プラクスエア・テクノロジー ・インコーポレイテッド アメリカ合衆国06810-5113コ ネティカット州 ダンパリー、 オールド・リッジパリー・ロ ード39 500373998 ビービー・アモコ・コーポレ イション アメリカ合衆国60601イリノイ 州シカゴ、イー・ランドルフ ・ドライブ200 代理人 100067817 倉内 基弘(外1名)

上記は出願公開前に承継されたものである。

第2部門(3)

## 出願人の名義変更

(平成13年1月16日(2001.1.16)発行)

特許 公開番号	分類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2000-218545	B24C 1/10		平11- 17423	000005108 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台四 丁目6番地 592001252 日立機装株式会社 茨城県日立市会▲瀬▼町2丁 目番1号 598109039 株式会社日立茨城ビジネスエ ンジニアリング 茨城県日立市幸町三丁目1番 1号 上記3名の代理人 100078134 武 頭次郎 390023928 日立エンジニアリング株式会 社 茨城県日立市幸町3丁目2番 1号 上記1名の代理人 100075096 作田 康夫	000005108 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台四 丁目6番地 598109039 株式会社日立茨城ビジネスエ ンジニアリング 茨城県日立市幸町三丁目1番 1号 上記2名の代理人 100078134 武 頭次郎 390023928 日立エンジニアリング株式会 社 茨城県日立市幸町3丁目2番 1号 株式会社日立エンジニアリン グサービス 茨城県日立市幸町3丁目2番 2号 上記2名の代理人 100075096 作田 康夫

上記は出願公開前に承継されたものである。

第2部門(5)

## 出願人の名義変更

(平成13年1月16日(2001.1.16)発行)

特許 公開番号	分類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2000-225971	B62H 1/12		平11-251026	599126420 金 成京 大韓民国釜山市沙上区毛羅洞 657-12 500058545 李 五杰 大韓民国西尉市中梁区新内1 洞479 中央ハイツアパートメ ント4-209 代理人 100107685 高橋 健	500058545 李 五杰 大韓民国西尉市中梁区新内1 洞479 中央ハイツアパートメ ント4-209 代理人 100107685 高橋 健

上記は出願公開前に承継されたものである。

第2部門(7)

## 出願人の名義変更

(平成13年1月16日(2001.1.16)発行)

特許 公開番号	分類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2000-219477	B66C 1/26		平11- 19884	591061127 建設省北陸地方建設局長 新潟県新潟市白山浦1丁目425 番2 391023518 社団法人日本建設機械化協会 東京都港区芝公園3丁目5番 8号 594056925 株式会社エムシーエム 愛知県名古屋市天白区植田東 二丁目1014番地 000001199 株式会社神戸製鋼所 兵庫県神戸市中央区脇浜町1 丁目3番18号 000105682 コベルコ建機エンジニアリング株式会社 広島県広島市安佐南区祇園3 丁目12番25号 代理人 100105692 明田 華	591061127 建設省北陸地方建設局長 新潟県新潟市白山浦1丁目425 番2 391023518 社団法人日本建設機械化協会 東京都港区芝公園3丁目5番 8号 594056925 株式会社エムシーエム 愛知県名古屋市天白区植田東 二丁目1014番地 000105682 コベルコ建機エンジニアリング株式会社 広島県広島市安佐南区祇園3 丁目12番25号 代理人 100105692 明田 華

上記は出願公開前に承継されたものである。

第3部門(1)

## 正 誤 表

(平成13年1月16日(2001.1.16)発行)

特許 公開番号	分類	識別 記号	箇所	誤	正
2000-247741	C04B 35/54		発明者氏名	野崎 秀彦内	野崎 秀彦

第3部門(2)

## 正誤表

(平成13年1月16日(2001.1.16)発行)

特許公開番号	分類	識別記号	箇所	誤	正
2000-226338	A61K 49/00		優先権	優先権主張番号 07/886789 優先日 平成4年4月7日 (1992.4.7) 優先権主張国 米国(US)	優先権主張番号 07/866789 優先日 平成4年4月7日 (1992.4.7) 優先権主張国 米国(US)

第3部門(2)

## 出願人の名義変更

(平成13年1月16日(2001.1.16)発行)

特許公開番号	分類	識別記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2000-226340	C07B 51/00		平11- 27135	000005968 三菱化学株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目 5番2号 代理人 100103997 長谷川 晓司	596156668 シップレーカンパニー エル エル シー アメリカ合衆国01752マサチュ ーセッツ州マルボロ フォレ スト・ストリート455 代理人 100073139 千田 稔(外2名)
2000-281611	C07C 41/06		平11- 87965	000005968 三菱化学株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目 5番2号 代理人 100103997 長谷川 晓司	596156668 シップレーカンパニー エル エル シー アメリカ合衆国01752マサチュ ーセッツ州マルボロ フォレ スト・ストリート455 代理人 100073139 千田 稔(外2名)

上記は出願公開前に承継されたものである。

第3部門(3)

## 正 誤 表

(平成13年1月16日(2001.1.16)発行)

特許 公開番号	分類	識別 記号	箇所	誤	正
2000-239669	C10G 47/20		請求項	19 新井 一彦前田 和章	20 新井 一彦
2000-248002	C08B 37/08		発明者氏名		

第3部門(4)

## 正誤表

(平成13年1月16日(2001.1.16)発行)

特許公開番号	分類	識別記号	箇所	誤	正
2000-239887	C25D 5/00		適用条文	脱落	特許法第30条第1項の適用申請有り

第5部門(2)

## 出願人の名義変更

(平成13年1月16日(2001.1.16)発行)

特許 公開番号	分類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2000-230515	F15B 21/04		平11- 35866	000001199 株式会社神戸製鋼所 兵庫県神戸市中央区臨浜町1 丁目3番18号 000004019 株式会社ナブコ 兵庫県神戸市中央区臨浜海岸 通1番46号 代理人 100067828 小谷 悅司(外2名)	000246273 コベルコ建機株式会社 広島県広島市安佐南区祇園3 丁目12番4号 000004019 株式会社ナブコ 兵庫県神戸市中央区臨浜海岸 通1番46号 上記1名 代理人 100067828 小谷 悅司(外2名)

上記は出願公開前に承継されたものである。